

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-105630

⑬ Int. Cl.⁴
A 61 K 39/39識別記号 庁内整理番号
7043-4C

⑭ 公開 昭和60年(1985)6月11日

審査請求 未請求 発明の数 6 (全16頁) 1/6

⑯ 発明の名称 ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体を基礎とするアジュバント

⑰ 特 願 昭59-174861

⑱ 出 願 昭59(1984)8月21日

優先権主張 ⑲ 1983年8月22日 ⑳ 米国(U S)㉑ 525190

㉒ 発 明 者 アンソニー・クリフォード・アリソン アメリカ合衆国カリフォルニア 94002、ベルモント、ハステイングス・ドライブ 2513番

㉓ 発 明 者 ノエレン・エルバ・バイアーズ アメリカ合衆国カリフォルニア 94087、サニーベイル、シラキューズ・ドライブ 1091番

㉔ 出 願 人 シンテックス(ユー・エス・エイ)インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア 94304、バーロ・アルト、ヒルビュー・アベニュー 3401番

㉕ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

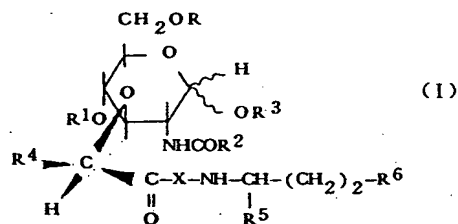
ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体を基礎とするアジュバント

2. 特許請求の範囲

1. 免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2～4.9容量% (V/V)である多相を形成し得る量の非毒性ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体、量が0.05～2.5容量% (V/V)の間である多相を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、アジュバント組成物。

2. 糖ペプチドが0.01～2重量/容量%の間の量で存在する、特許請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 糖ペプチドが式：



(I)
〔式中、RおよびR₁は同一または異なつて、水素または1～22個の炭素原子を有するアシル基であり、

R₂は1～22個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アルキル基、または6～10個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アリール基であり、

R₃は水素、アルキル、または7～10個の炭素原子を有するアリールであり、

R₄は水素または1～6個の炭素原子を有するアルキルであり、

Xは、アラニル、バニル、ロイシル、イソロイシル、α-アミノブチリル、スレオニル、メチオニル、システイニル、グルタミル、グルタミンニル、アスパルチル、フェニルアラニル、チロシル、ト

リプトファン、リシル、オルニチン、アルギニン、ヒスチジン、アスパルギン、プロリン、ヒドロキシプロリン、セリン、またはグリシンより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、

R_5 はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示し、

R_6 はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示す]

で示される化合物であり、ブロック重合体が3,250～4,000の間の分子量を有するポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が0.2～20% (容量/容量) であり、生理食塩水がリン酸緩衝液で緩衝化された生理食塩水である、特許請求の範囲第2項記載の組成物。

4. 式(1)の糖ペプチドにおいて、 R および R_1 は同一または異なつて、水素または1～22個の炭素原子を有するアシル基から成る群から選ばれ、 R_2 はメチルであり、 R_3 は水素であり、 X は、 L -セリン、 L -アラニン、 L -バリン、 L -ロイシル、 L -イソロイシル、 L - α -アミノブチ

リル、 L -セリン、 L -スレオニン、 L -メチオニン、 L -システイン、 L -フェニルアラニン、 L -チロシン、 L -トリプトファン、 L -リジン、 L -オルニチン、 L -アルギニン、 L -ヒスチジン、 L -グルタミン、 L -グルタミン、 L -アスパルチン、 L -アスパラギン、 L -プロリン、または L -ヒドロキシプロリンより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、0.01～1% (W/V) の間の量が存在し；ブロック重合体は分子量が2,750～3,550の間のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合は5～20% であり、この重合体は0.2～20% (V/V) の間の量が存在し；グリコールエーテル界面活性剤は、0.2～1% (V/V) の量で存在するポリソルベート界面活性剤である、特許請求の範囲第3項記載の組成物。

5. 糖ペプチドが、式(1)において、 R 、 R_1 および R_3 が水素であり、 R_2 がメチルであり、 R_4 がメチルまたは水素であり、 X が L -バリン、 L -アラニン、 L -セリン、 L -スレオニンまた

は L - α -アミノブチリルであり、 R_5 がカルボキシル、カルバモイルまたは n -ブチルカルボキシレートであり、 R_6 がカルボキシルまたはカルバモイルの化合物である、特許請求の範囲第4項記載の組成物。

6. 糖ペプチドが、 N -アセチルムラミル- L -スレオニン- D -イソグルタミン、 N -アセチル- L - α -アミノブチリル- D -イソグルタミン、6- O -ステアロイル- N -アセチルムラミル- L - α -アミノブチリル- D -イソグルタミン、または N -アセチルデスメチルムラミル- L -アラニン- D -イソグルタミンであつて0.01～1% (W/V) の間の量が存在し；ブロック重合体が分子量約3,550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が10% であり、この重合体は0.2～5% (V/V) の間の量が存在し；ポリソルベートがトウイーン(TWEEN) 80 である、特許請求の範囲第5項記載の組成物。

7. 糖ペプチドが、 n -ブチル- N -アセチル

ムラミル- L -アラニン- D -グルタミネート、 N -アセチルムラミル- L -アラニン- D -イソグルタミン、または N -アセチルムラミル- L -セリン- D -イソグルタミンであり；重合体が分子量約3,550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中の割合として10% のポリオキシエチレンを含有する、特許請求の範囲第5項記載の組成物。

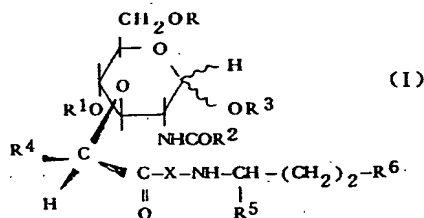
8. 糖ペプチドが0.5% (w/v) の量で存在する N -アセチルムラミル- L -スレオニン- D -イソグルタミンであり、重合体が2.5% の量で存在する、特許請求の範囲第6項記載の組成物。

9. 免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド；量が0.2～49容量% (v/v) である多相を形成し得る量の非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック重合体；量が0.05～25容量% (v/v) の間である多相を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤；量が1～30容量% (v/v) の間である代謝可能な非毒性の油；および容量を十分とするに足る量

の緩衝等張生理食塩水から成る、アジュバント組成物。

10. 糖ペプチドが0.01～2重量/容量%の量の量で存在する、特許請求の範囲第9項記載の組成物。

11. 糖ペプチドが式：



〔式中、RおよびR₁は同一または異なつて、水素または1～22個の炭素原子を有するアシル基であり、

R₂は1～22個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アルキル基、または6～10個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アリール基であり、

R₃は水素、アルキル、または7～10個の炭素原子を有するアリールであり、

物。

12. 式(I)の糖ペプチドにおいて、RおよびR₁は同一または異なつて、水素または1～22個の炭素原子を有するアシル基から成る群から選ばれ、R₂はメチルであり、R₃は水素であり、Xは、L-セリル、L-アラニル、L-バリル、L-ロイシル、L-イソロイシル、L-α-アミノブチリル、L-セリル、L-スレオニル、L-メチオニル、L-システイニル、L-フェニルアラニル、L-チロシル、L-トリプトファン、L-リシル、L-オルニチル、L-アルギニル、L-ヒスチジル、L-グルタミル、L-グルタミン、L-アスパルチル、L-アスパラギニル、L-プロリル、またはL-ヒドロキシプロリルより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、0.01～1% (w/v) の間の量が存在し；ブロック共重合体は分子量が2,750～3,550の間のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合は5～20%であり、この共重合体は0.2～20% (v/v) の間の量が存在し；油

R₄は水素または1～6個の炭素原子を有するアルキルであり、

Xは、アラニル、バリル、ロイシル、イソロイシル、α-アミノブチリル、スレオニル、メチオニル、システイニル、グルタミル、グルタミン、アスパルチル、フェニルアラニル、チロシル、トリプトファン、リシル、オルニチニル、アルギニル、ヒスチジル、アスパルギニル、プロリル、ヒドロキシプロリル、セリル、またはグリシルより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、

R₅はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示し、

R₆はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示す]

で示される化合物であり、ブロック重合体が3,250～4,000の間の分子量を有するポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が0.2～20% (容量/容量) であり、生理食塩水がリン酸緩衝液で緩衝化された生理食塩水である、特許請求の範囲第10項記載の組成物。

は1～10% (v/v) の間の量で存在するスクアレンまたはスクアランであり；グリコールエーテル界面活性剤は、0.2～1% (v/v) の量で存在するポリソルベートである、特許請求の範囲第11項記載の組成物。

13. 糖ペプチドが、式(I)において、R、R₁およびR₃が水素であり、R₂がメチルであり、R₄がメチルまたは水素であり、XがL-バリル、L-アラニル、L-セリル、L-スレオニルまたはL-α-アミノブチリルであり、R₅がカルボキシル、カルバモイルまたはn-ブチルカルボキシレートであり、R₆がカルボキシルまたはカルバモイルの化合物である、特許請求の範囲第12項記載の組成物。

14. 糖ペプチドが、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、6-O-ステアロイル-N-アセチルムラミル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、またはN-アセチルデスメチルムラミル-L-

—アラニル—D—イソグルタミンであつて0.01～1% (w/v) の間の量が存在し；ブロック重合体が分子量約3550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が10%であり、この重合体は0.2～5% (v/v) の間の量が存在し；ポリソルベートが^{トウイーン} TWEEN) 80である、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

15. 糖ペプチドが、n—ブチル—N—アセチルムラミル—L—アラニル—D—グルタミネート、N—アセチルムラミル—L—アラニル—D—イソグルタミン、またはN—アセチルムラミル—L—セリル—D—イソグルタミンであり；共重合体が分子量約3550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中の割合として10%のポリオキシエチレンを含有する、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

16. 糖ペプチドが0.5% (w/v) の量で存在するN—アセチルムラミル—L—スレオニル—D—イソグルタミンであり、共重合体が2.5%の量

で存在する、特許請求の範囲第14項記載の組成物。

17. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2～4.9容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン—ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05～2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

18. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2～4.9容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン—ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05～2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、量が1～30容量% (v/v) の間である代謝可能な非毒性の油、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

19. 抗原を第1項記載のアジュバント組成物と混合することにより多相系を形成させ、この多相

系を鳥または哺乳動物に投与することからなる、抗原の免疫原性の強化方法。

20. 抗原を第9項記載のアジュバント組成物と混合することにより多相系を形成させ、この多相系を鳥または哺乳動物に投与することからなる、抗原の免疫原性の強化方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はアジュバントおよびワクチンに関する。さらに詳しくは、本発明はポリオキシプロピレン—ポリオキシエチレンブロック重合体を基礎とするアジュバントおよびワクチンに関するものである。

〔従来の技術〕

抗原の水溶液を鉱物油単独または鉱物油と結核菌 (*M. tuberculosis*) をもつて乳化することにより、この抗原の免疫原性が強化されるというフロインドの発見は、抗原に対する生体の体液性および細胞性免疫反応を増強させるために第二の物質を使用するという概念の基礎を形成した。フ

ロインドの完全および不完全アジュバントの必須成分は鉱物油である。この成分は、抗原に対する体液性の反応を増強させるのに中心的役割を果たす。しかしながら鉱物油は実験的環境での使用にしか許容できない。完全フロインドアジュバント中のマイコバクテリウムは細胞性免疫の著明な強化に必須のものである。

当初、フロインドの不完全または完全アジュバント中の界面活性剤の果たす役割には殊んど注意が払われなかつたが、その後の研究により、幾つかの例においては界面活性剤がアジュバントの性格を単独で本質的に説明するものであり得ることが指摘された。グラム陰性菌のエンドトキシン中の脂質A部分およびマイコバクテリウム中のトレハロースジマイコレートのような多くの天然に存在する界面活性物質は、これら天然に存在する界面活性剤のうちでも最も強力なアジュバントである。哺乳動物細胞の構成成分であるリン脂質リンレシチンもまたアジュバントの活性を有することが見出されている (B. Arnold 等, Eur. J.

Immunol., 9:363~366(1979))。

さらに、数種の合成界面活性剤、例えばジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDA)およびある種のポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体が、アジュバントとしての活性を有するとして報告されている(H. Snippe等、Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 65:390~398(1981)を参照せよ)。また、これに加えてR. Hunter等はJournal of Immunology, 127:1244~1250に、ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体を水中油型アジュバント組成物の界面活性剤成分として使用した場合、マウスにおける対BSA抗体の形成が増加することを報告している。

これらの天然および合成の界面活性剤は、ある程度のアジュバント効果を示すものの、発表されている限りにおいてはDDAについての特定の試験方法論を除いては、完全または不完全フロイドアジュバントを使用した際の免疫強化活性に

単独で匹敵する界面活性剤は無いという結論が立証されている。しかし、鯊物油とマイコバクテリウムは共に皮下注射時の有害な副作用を有するため、フロイドの不完全または完全アジュバントを一般的なワクチン接種の目的に使用することはできず、その結果、このものは政府監視機関により飼育動物またはヒトに対する使用が認可されていない。鯊物油はその使用が実験動物に限定されている。

しかしながら、抗原の免疫原性を強化する何らかの手段が実質的に必要とされている。このことは、今やウイルスのサブユニットおよびその他の蛋白抗原が組換えDNA技術によつて製造されているため、特に真実となる。その上、抗原性があるとして知られるより大きな蛋白に由来する天然または合成のペプチド断片は、蛋白全体または蛋白全体を含む物質の混合物より好んで投与される。

有用な免疫反応を引き起こすためには、あるタイプのアジュバントと共に蛋白抗原およびハプテンを投与せねばならない。上記のように鯊物油お

よびマイコバクテリウムのいずれも用いることはできない。必要な免疫性の強化は糖ペプチドが提供可能であろうが、この物質はエマルゲンとして対象に与えられる時に最も効果的である。鯊物油はその毒性のゆえに使用できないので、抗原の投与には代替りのエマルゲン形成物質が必要となる。

(発明の開示)

免疫強化性糖ペプチドおよび抗原を、非毒性ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体および多相系を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする非毒性界面活性剤と調合(connect)すると、この抗原の免疫原性が鯊物油を使用した場合と同じ機作で同じ程度増加することが発見された。ブロック重合体は免疫反応を達成するのに不可欠ではあるが、最大の反応は、この多相系が非イオン性グリコールエーテルを基礎とする界面活性剤のごとき何らかの清浄剤によつて安定化する時にのみ、最も効果的に達成されることがわかった。代謝可能な油の存在は同様にこの調製物の有効性を増大させ得る。ポリオキシ

プロピレンーポリオキシエチレンブロック重合体およびグリコールエーテル界面活性剤は非毒性であるため、このアジュバント調製物は、鳥および哺乳動物に投与する抗原の免疫原性を増大させる手段として安全に使用できる。

発明の要約

本発明により、免疫強化量の糖ペプチド、多相を形成し得る量の非毒性ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック共重合体、多相を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、所望ならば炭素原子数6~30の代謝可能な油、および容量を十分量にするだけの緩衝等張水溶液からなる、ワクチンのためのアジュバント物質が得られる。

第2の態様においては、本発明は、有効量の抗原、免疫強化量の糖ペプチド、多相を形成し得る量の非毒性ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック共重合体、多相を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、所望ならば炭素原子数6~30の代謝可能な油、お

よび容量を十分量にするだけの緩衝等張水溶液からなる、ワクチン組成物に関する。

さらに別の態様においては、本発明は抗原の免疫原性を強化する方法に関し、この方法は、免疫強化量の糖ペプチド、多相を形成し得る量の非毒性ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック共重合体、多相を安定化する量のグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、所望ならば炭素原子数6〜30の代謝可能な油、および容量を十分量にするだけの緩衝等張水溶液からなるアジュバント物質をもつて抗原を乳化し、かつそのエマルジョンを鳥または哺乳動物に投与することからなる。

発明の詳細な記載

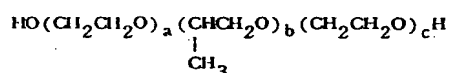
上に指摘したように本発明の特長は、アジュバント物質としてグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤のごとき第二の界面活性剤と組み合わせたポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロック共重合体を使用するところにあり、このアジュバント物質は、免疫強化量の糖ペプチドお

よび抗原と共にエマルジョンを形成すると、抗原の免疫原性を強化する。この調製物はさらに、鳥類および哺乳動物に安全に投与できる調製物を意味するという点で独自のものである。こうしてフロイドの不完全または完全アジュバント中で抗原が投与された場合に得られる反応に匹敵する体液性および細胞媒介性免疫反応を抗原が誘起すると思われる注射可能なワクチンを製造することができる。このような特性を有するワクチンは、生体の防御反応を発現させるために抗体を投与せねばならない回数を低減させるのに役立ち得る。加えて防御反応を誘起するために投与する必要のある抗原の量を減少させることができる。

本発明のポリオキシプロピレンーポリオキシエチレン(POP-POE)ブロック共重合体は、商業的には商標プルロニック(Pluronic)ポリオールとして知られる広く入手可能な物質である。この化合物は、低分子量の活性水素化合物、通常プロピレングリコールに、プロピレンオキサイド次いでエチレンオキサイドを連続的に付加するこ

とによつて製造できる。これらポリオールの特性は、ポリオキシエチレングリコール核の分子量および生成物中のポリオキシプロピレン対ポリオキシエチレンの比率によつて決定される。約900またはこれ以上の分子量を有するポリオキシプロピレングリコールは水に不溶で、ポリオールに対し疎水性を付与する。通常総重量の約10%〜90%を構成するポリエチレングリコールは、このポリマーに水溶性を付与し、こうして界面活性を有する化合物が結果として形成される。

POP-POEブロック重合体は、実験的に以下の式によつて表わすことができる：



〔式中、aおよびcは統計上等しい〕。これらの化合物はランステッドに対して登録された米国特許第2,674,619号に開示の方法により製造することができる。この化合物を製造する最も普通の手段は、二官能性反応開始剤であるプロピレングリコールを触媒量の無水水酸化ナトリウムの存在

下にプロピレンオキサイドと反応させ、この反応を所望の分子量が得られるまで続行させることである。次いでブロック共重合体を生成させるため、規定量のエチレンオキサイドを同じ反応容器に添加する。

このブロック重合体ポリオールの分子量は、およそ1,000〜16,000の範囲である。この発明によつて特に興味ある重合体は、平均分子量が約5,000および15,500の間の化合物である。このような物質は市販されており、幾つかの供給源、例えばBASF-ワイアンドフト・コーポレーション(Parsippany N.J. 07054)およびE. I. デュポンから入手可能である。

プルロニックの名称の下にBASF-ワイアンドフトから入手できるPOP-POEポリオールは、2または3桁の数字を伴う接頭辞によつて区別される。この接頭辞はL、PおよびFであり、各々の重合体の物理的性状、即ちL-液体、P-ペースト、そしてF-フレーク状にできる固体、を示す。2および3桁の数は、全分子中でポリオ

キシエチレンのパーセントと比較したポリオキシプロピレン疎水塩基の平均分子量を表わすのに使用される。ブルロニック L-101 を例にとる。最初の2桁はポリオキシプロピレン塩基が代表的な分子量として3,250を有する事実を示し、第3桁目はポリマー中に10%のポリオキシエチレンが存在することを示す。第2の例としてブルロニック F-108 を挙げる。ここでもやはり「10」は代表的な分子量が3,250のポリオキシプロピレン塩基を意味し、一方「8」はポリオキシエチレンが全分子中に80%含まれることを示す。

本発明によつて最も興味深いブロック重合体は、約15°～40°の範囲の温度以上で液体であるものである。さらに、特定の温度範囲で液体である、液体およびペースト、液体、ペーストおよびフレーク状にできる固体、または液体およびフレーク状にできる固体の重合体混合物もまたこの発明に利用できる。

好ましいブロック重合体は、分子量が約2250および4300の間の範囲であるPOP塩基およ

び総量約／および30%の間の範囲であるPOEを有する物質である。さらに好ましいのは、POPが3250および4000の間の分子量を持ち、POE成分が10～20%含まれる重合体である。ブルロニックポリオール L-101、L-121 および L-122 がこの定義に該当する。最も好ましいのはPOPの分子量が4000でありPOEの量が10%である重合体、またはPOPの分子量が3250でありPOEの量が10%である重合体であり、各々ブルロニックポリオール L-121 および L-101 が例示できる。

多相を形成し得る重合体の量とは、ミセル、またはより広範にはエマルジョンもしくは懸濁液として特徴付けられる系を形成し得る量を意味する。本発明の目的のためには、これは0.2～49容重量%の間の量である。より好ましい量は0.2～20% (v/v) の間であるが5%までがさらに好ましく、2.5%が最も好適である。

これらの組成物は、形成された多相組成物を安定化するための非毒性非イオン性清浄剤を使用す

ることによつて最もよくその効果が発現できる。ブロック重合体を単独で使用した場合、抗原は幾らか増大した免疫原性を示すが、その効果は非イオン性清浄剤が存在する場合に観察される効果と比較すれば小さいものとなる。この非イオン性清浄剤は、乳化および懸濁化という2目的を達成するために存在し、かつブロック重合体に比べて少量であるという点から、乳化剤または懸濁化剤としても特徴付けられ、このブロック重合体は本発明の組成物中では「油」として特徴付けられる。

薬学で一般に使用される乳化および懸濁化剤は数多くある。天然由来の物質には、樹木から採るゴム、植物性蛋白、アルギネートおよびセルロースのごとき糖を基礎とする重合体等がある。ある種のオキシ重合体または炭素骨核上で置換された水酸基もしくはその他の水溶性置換基を有する重合体は、界面活性を有し、これには例えばポピドン、ポリビニルアルコール、並びにグリコールエーテルを基礎とするモノおよび多官能性化合物がある。長鎖脂肪酸由来の化合物は、本発明に使用

できる乳化および懸濁化剤の実質的第三の群を形成する。非毒性である限り、上記のいかなる界面活性剤をも使用することができるが、グリコールエーテル由来の化合物が本発明における最も良い乳化剤である。

グリコールエーテルを基礎とする化合物群のうち、最も簡単な化合物はエチレンオキシドである。この最も簡単なグリコールの分子内または環状エーテル、エチレングリコール、エチレングリコールのモノおよびジエーテルもまたよく知られている。グリコールエーテル類の重要な群にポリエチレングリコール類がある。ここで最も興味ある化合物は、PEG 200、300、400、600 および 900 である。

特に有用な界面活性剤群は、ソルビタンを基礎とする非イオン性界面活性剤である。この界面活性剤は、ソルビトールを脱水して1,4-ソルビタンを得、次いでこれを1またはそれ以上の当量の脂肪酸と反応させて製造するか、またはこの脂肪酸置換基をさらにエチレンオキシドと反応させ

て第2の界面活性剤群を得る。

脂肪酸置換ソルビタン界面活性剤は、1,4-ソルビタンをラウリル酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸のような脂肪酸または類似の長鎖脂肪酸と反応させて1,4-ソルビタンモノエステル、1,4-ソルビタンセスキエステルまたは1,4-ソルビタントリエステルを得ることにより製造できる。これら界面活性剤の通用名は、例えばソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンセスキオレエート、ソルビタントリオレエートである。これらの界面活性剤は市販されており、通常、置換ソルビタンの種々のモノ、ジおよびトリエステルを識別する文字または数字の付いたスパン(SPAN)またはアーラセル(ARLACEL)の名称の下に入手できる。

スパンおよびアーラセル界面活性剤は親水性であり、かつ一般に油に可溶または分散可能であり、油中水型エマルジョンを形成し易い。これらは殆

んど有機溶媒にも可溶である。一般に水には不溶であるが分散可能である。通常これらの界面活性剤は、約1.8~8.6の親水親油平衡(HLB)値を持つ。このような界面活性剤は、当該分野で知られる手段により簡単に製造できるか、または例えばICIアメリカズ・インコーポレイテッド(ICI, America's Inc., Wilmington, Delaware 在)から商標アトラス(ATLAS)の下に入手可能である。

関連した界面活性剤の群には、ポリオキシエチレンソルビタンモノエステルおよびポリオキシエチレンソルビタントリエステルがある。これらの物質は、エチレンオキサイドを1,4-ソルビタンモノエステルまたはトリエステルに添加することにより製造できる。ポリオキシエチレンの付加は、親油性のソルビタンモノまたはトリエステル界面活性剤を、通常水に可溶または分散可能で有機溶媒には種々の程度で可溶な親水性界面活性剤とする。

トウイーン(TWEEN)の商標の下で商業的に

入手可能なこれらの物質は、水中油型エマルジョン、分散液の製造のためにまたは油を可溶化して無水軟膏を水溶性もしくは水洗可能にするのに有用である。トウイーン界面活性剤は関連するソルビタンモノエステルまたはトリエステル界面活性剤と組み合わせてエマルジョンの安定性を強化することができる。トウイーン界面活性剤は一般に9.6~16.7のHLB値を有する。トウイーン界面活性剤は多くの製造業者から商業的に入手でき、例えばアトラス界面活性剤の商標の下に、ICIアメリカズ・インコーポレイテッド(Wilmington, Delaware 在)から入手できる。

単独またはスパン、アーラセルおよびトウイーン界面活性剤と共に使用することのできる第3の非イオン界面活性剤の群は、エチレンオキサイドを長鎖脂肪酸と反応させて得られるポリオキシエチレン脂肪酸類である。最も普通に手に入るこの型の界面活性剤はMYRJの名称で販売されており、これはステアリン酸のポリオキシエチレン誘導体である。MYRJ界面活性剤は親水性であり、

トウイーン界面活性剤のように水に可溶または分散可能である。このMYRJ界面活性剤は、エマルジョン生成の際の使用のためにトウイーン界面活性剤と、またはトウイーン/スパンもしくはアーラセル混合物と混和してもよい。MYRJ界面活性剤は当該分野で知られる方法によつて製造できるか、またはICIアメリカズ・インコーポレイテッドより商業的に入手可能である。

ポリオキシエチレンを基礎とする非イオン性界面活性剤の第4の群は、ラウリル、アセチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導できるポリオキシエチレン脂肪酸エーテルである。この物質は、前記のようにエチレンオキサイドを脂肪酸アルコールに添加することによつて製造できる。この界面活性剤の市販名はBRIJである。BRIJ界面活性剤は、界面活性剤中のポリオキシエチレン部分の大きさによつて親水性にも親油性にもなり得る。この化合物の製造は文献より達成できるが、ICIアメリカズ・インコーポレイテッドのような商業的供給源からも簡単に入手す

ることができる。

本発明の実施に使用できる可能性のあるその他の非イオン性界面活性剤は、例えば以下のような物質である：ポリオキシエチレン、ポリオール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシプロピレン脂肪酸エーテル、ポリオキシエチレンを含有する密ロウ、ポリオキシエチレンラノリン誘導体、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリド、グリセロール脂肪酸エステル、またはその他の12～21個の炭素原子を有する長鎖脂肪酸のポリオキシエチレン酸アルコールもしくはエーテル誘導体。

本発明のアジュバントおよびワクチン調製物は多相系を意図しているので、HLB値が約7～16のエマルジョン形成性非イオン界面活性剤を選択するのが好ましい。この値は、トウイーン界面活性剤のような単一の非イオン性界面活性剤を使用することにより得られ、または界面活性剤混合物、例えばソルビタンモノ、ジもしくはトリエステルと親和性ポリオキシエチレンソルビタンモノもし

くはトリエステルを基礎とする界面活性剤；ソルビタンエステル-ポリオキシエチレン脂肪酸；ポリオキシエチレンラノリン由来の界面活性剤と組み合わせたソルビタンエステル；高HLBのポリオキシエチレン脂肪酸エーテル界面活性剤と組み合わせたソルビタンエステル界面活性剤；またはポリエチレン脂肪酸エーテル界面活性剤もしくはポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸を使用することにより達成できる。

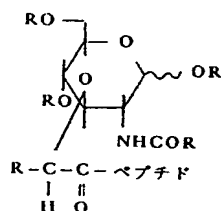
本発明の実施にあたり、エマルジョン安定化非イオン性界面活性剤としては、単一の非イオン性界面活性剤、特にトウイーン界面活性剤の使用がより好ましい。前記の界面活性剤の中で最も好適なのはトウイーン80と命名された界面活性剤、即ち、別名ポリソルベート80として知られるポリオキシエチレン20ソルビタンモノオレエートである。

多相系の安定化は、その物質が室温で固体であるか液体であるかに応じて、通常、界面活性剤の共存させる量を0.05～2.5重量% (w/v) ま

たは容量% (v/v) とすることによつて達成できる。0.2%ないし1%が好ましい。

本発明の免疫反応刺激性糖ペプチドはN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンから誘導される関連物質であり、この物質はエロース等 (Biochem. & Biophys. Res. Comm., Vol 59, 4, 1317 (1974)) によつて、フロインドの完全アジュバントのマイコバクテリウム構成成分であるM. tuberculosisにおいて免疫学的アジュバント活性を有する最小有効単位であることが決定された。数多くのジペプチドおよびポリペプチド置換ムラミン酸誘導体がその後開発され、免疫刺激活性を有することが見出された。

これらの糖ペプチドは多様な化合物群であるが、一般に以下の式によつて表わされる：



[式中、ピラン環の酸素は水素、アルキルまたはアシル等により置換されているか、または特に6位の酸素については、窒素を基礎とする置換基で置き換わつていてよく、2-アミノ基はアシル基またはその他のアミドであり、ラクチル側鎖は修飾され、即ちエチルまたは他の2位アルキル基であり、ペプチド官能基はジペプチドまたはポリペプチドである]。

このピラノシル化合物のフラノシル同族体もまた免疫強化活性を有し、本発明にとつて有用である。

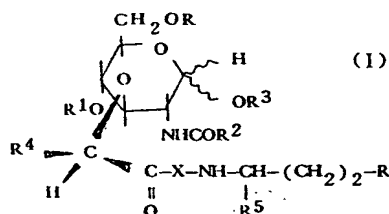
本発明の糖ペプチドの中には、米国特許第4,235,771号および4,186,194号に記載があるようなメソ-α-ε-ジアミノピメリン酸と結合したジサツカライドおよびテトラサツカライドがある。

本発明の実施に使用してよい免疫反応刺激性糖ペプチドは、米国特許第4,094,971号；4,101,536号；4,153,684号；4,235,771号；4,323,559号；4,327,085号；4,185,089号；4,082,736号；4,369,178号、4,314,998号および4,082,735号；

ならびに4,186,194号に開示されている。これらの特許に開示されている糖ペプチドは、参照のために引用し、ここにその全容を開示する代りとし、本明細書の一部とした。日本国特許出願のJ5 40-79227、J5 4-079228、J5 4-1206696およびJ A-028012の化合物もまた本発明の実施に有用である。

これらの化合物の製造方法は文献に開示されており、よく知られている。製造工程の具体例は米国特許第4,082,736号および4,082,735号にみることができる。さらに類似の製造工程は、前段落に引用した米国特許に見出すことができる。

好ましい糖ペプチドは以下の式(I)の構造を有する：



R₆はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示す}。

アルキルとはメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルまたはヘプチル、および異性体により例示される1〜7個の炭素原子を有する直鎖または分枝状基である。低級アルキルとは1〜4の炭素原子を有する基である。

置換されていてもよいベンジル基とは、例えば低級アルキル、遊離の、エーテル化された、またはエステル化されたヒドロキシまたはメルカプト基、例えば低級アルコキシまたは低級アルキレンジオキシ基、ならびに低級アルキルメルカプトまたはトリフルオロメチル基および／またはハロゲン原子によつて、芳香核上でモノ置換、ジ置換、または多置換されていてもよいベンジル基である。

エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基とは、カルボキシル基自身、またはメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールのごとき低級アルカノールをもつてエステル化されているカルボキシル基、または窒素原子上

(式中、RおよびR₁は同一または異なつて、水素または1〜22個の炭素原子を有するアシル基であり、

R₂は1〜22個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アルキル基、または6〜10個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アリール基であり、

R₃は水素、アルキル、または7〜10個の炭素原子を有するアリールであり、

R₄は水素または1〜6個の炭素原子を有するアルキルであり、

Xは、アラニル、バリル、ロイシル、イソロイシル、α-アミノブチリル、スレオニル、メチオニル、システイニル、グルタミル、グルタミニル、アスパルチル、フェニルアラニル、チロシル、トリプトファン、リシル、オルニチニル、アルギニル、ヒスチジル、アスパルギニル、プロリル、ヒドロキシプロリル、セリル、またはグリシルより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、

R₅はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示し、

で非置換、もしくはアルキル、特に低級アルキル、アリール、特にフェニル、もしくはアラルキル、特にベンジルによつてモノ置換またはジ置換されているカルバモイル基である。このカルバモイル基は、ブチリデンまたはベンチリデン基のごときアルキリデン基によつても置換されていてもよい。さらにこのカルバモイル基 R₅は、窒素原子上でカルバモイルメチル基により置換されていてもよい。

特に好ましい化合物は、RおよびR₁が同一または異なつており、水素または1〜22個の炭素原子を有するアシル基より成る群から選ばれ、R₂がメチルであり、R₃が水素であり、XがL-セリル、L-アラニル、L-バリル、L-ロイシル、L-イソロイシル、L-α-アミノブチリル、L-セリル、L-スレオニル、L-メチオニル、L-システイニル、L-フェニルアラニル、L-チロシル、L-トリプトファン、L-リシル、L-オルニチル、L-アルギニル、L-ヒスチジル、L-グルタミル、L-グルタミニル、L-

ーアスパルチル、L-アスパラギニル、L-プロリル、またはL-ヒドロキシプロリルより成る群から選ばれるアミノアシル基である。式(I)の化合物である。

より好ましい糖ペプチドの群は、R、R₁が水素または1~22個の炭素原子を有するアシル基であり、R₃(R₂)が水素であり、R₃(R₂)およびR₄がメチルであり、XがL-バリル、L-セリル、L-アラニル、L-スレオニルまたはL-α-アミノブチリルである式(I)の化合物である。

最も好ましいのは以下の化合物である：

N-アセチルムラミル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、

6-O-ステアロイル-N-アセチルムラミル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、

N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、

N-アセチルムラミル-L-バリル-D-イソグルタミン、

N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イ

ソグルタミン、

N-アセチル-デスメチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、

D-ブチル N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミネート、および

N-アセチルムラミル-L-セリル-D-イソグルタミン。

免疫刺激性糖ペプチドの有効量とは、ある抗原と併用して投与した際に、その糖ペプチドがアジュバント組成物中に含まれない場合に認められるタイター(力価)レベル以上にタイターレベルを増加させる効果を示す量ということになる。容易に理解できるように、各々の糖ペプチドは他の糖ペプチドとは異なる有効投与量の幅を持ち得る。したがって、本発明範囲内で可能性のある糖ペプチドの1つ1つに正確に適合する単一の投与量範囲を規定することはできない。しかし、通則としてこの糖ペプチドは0.01および2重量%容量%(w/v)の間の量が存在することが好ましいであろう。

より好ましい量は0.01~1%(w/v)である。

この調製物中に随意に存在してよい、もう1個の成分は、代謝可能な非毒性の油であつて、好ましくはアルカン、アルケン、アルキン、およびこれらに対応する酸およびアルコール、そのエーテルおよびエステル、ならびにその混合物を含み、好ましくは炭素原子数6~30個の物質であるが、上記のものに限定されるものではない。この油はアジュバントが投与される動物または鳥類の体によつて代謝され、かつ何らかの様式でその生体に対して毒性でない、あらゆる植物油、魚油、動物性油または合成により製造される油であつてよい。鉱物油および類似の石油蒸留油は、特にこの発明からは除外する。

本発明の油成分は、長鎖アルカン、アルケンまたはアルキン、またはそれらの遊離酸、その塩もしくはモノ、ジ、もしくはトリグリセライドのごときトリエステルのようなエステル、および1,2-プロパンジオールもしくは類似の多ヒドロキシアルコールのエステルの形の酸またはアルコール

誘導体であつてよい。アルコールは、モノまたは多官能酸、例えば酢酸、プロパン酸、クエン酸等を使用してアシル化してよい。油であつて、ここに述べた他の基準に合致する長鎖アルコール由来のエーテル類もまた使用することができる。

個々のアルカン、アルケンまたはアルキン基およびその酸またはアルコール誘導体は、6~30個の炭素原子を持つことができる。この基は直鎖または分枝鎖構造を有していてもよい。これは完全に飽和していても、また1もしくはそれ以上の二重結合またはアセチレン結合を持つてもよい。モノもしくはポリエステルまたはエーテルを基礎とする油を使用する場合、6~30個の炭素原子という制約は、総炭素数ではなく個々の脂肪酸または脂肪酸アルコール部分に適用する。

全ての代謝可能な油、特に動物、魚または植物源からの油は、本発明中で使用してよい。この油は投与される動物または鳥類により代謝されることが必須である。さもないと油成分は脂肪、肉芽腫もしくは脂肪腫さえ誘発する可能性があり、また、

代謝されなかつた油の消費者に対する有害な影響の故に、ワクチン接種された鳥および動物の肉が人間の消費に許容できなくなる可能性がある。

木の実、種子および穀物が、いわゆる植物油の供給源である。ピーナツ油、大豆油、コナツ油、およびオリーブ油が最も普通に利用できる典型的な木の実の油である。種子油には、サフラワー油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ種子油等が含まれる。穀物のグループでは、とうもろこし油が容易に入手できる。小麦、大麦、ライ麦、米、ライコムギ等、他の穀類の油も使用できるが、これらの油は小麦胚芽油を除いては容易に入手できず、したがって重要性は低い。しかしこれは、穀類の油は商業的に獲得がより困難であるという理由のみによる。

植物油を得る技術はよく開発されており、周知である。これらの組成物およびその他の類似の油は、例えばメルク・インデックス (Merck Index)、および食物の原材料、栄養物および食物技術中に見出すことができる。

より、動物脂肪から得ることができる。哺乳動物の乳からの脂肪および油は代謝可能であり、故に本発明の実施に使用することができる。分離、精製、ケン化方法および動物源から純粋な油を得るに必要とされるその他の手段は、当該分野でよく知られている。

油のもう1つの供給源は魚油である。殊んどの魚は容易に回収できる代謝可能な油を含んでいる。例えば、タラの肝油、サメの肝油および鯨脂のような鯨の油は、ここで使用してよい典型的な幾つかの魚油である。サメの肝油は、本発明にとつて特に好適なスクアレン、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサンとして知られる分枝鎖不飽和油を含有している。スクアレン、スクアランの飽和同族体もまた本発明にとり特に好ましい油である。スクアレンおよびスクアランを含む魚油は容易に商業的供給源から入手でき、または当該分野で知られた方法により得ることができる。

これらアジュバントおよびワクチン調製物の油

炭素原子数6~10個のグリセロールおよび1,2-プロパンジオールの脂肪酸エステルは、本来種子油中には存在しないが、木の実および種子の油を出発物質として適当な物質の加水分解、分離およびエステル化により製造できる。これらの生成物は、ネオビー (Neobee) の名称の下に、PVOインターナショナル・インコーポレイテッド (Chemical Specialities Division, 416 Division Street, Boonton, New Jersey 在) およびその他から入手できる。これら後者の物質の製造方法については、1982年1月21日出願の米国特許出願第3,414,030号を参照できる。

鳥類を含む動物由来の全ての油は、この発明のアジュバントおよびワクチンに使用してよい。動物性の油および脂肪は、トリグリセライドとして存在し、魚または植物からの油より高度に飽和しているため、生理的温度では通常固体である。しかしながら脂肪酸は、部分的または完全なトリグリセライドのケン化で遊離の脂肪酸を導くことに

成分は1~30% (容量/容量) の量で存在するが、好ましくは1~10% v/v の量である。5% v/v の濃度の油を使用するのが最も好ましい。

このアジュバント組成物の水性部分は、緩衝等張生理食塩水である。この組成物は非経口投与を意図しているので、組成物と生理的液体とのイオン濃度の差に帰因する投与後の組成物の膨潤または速い吸収を防止するため、この溶液の緊張性、即ち浸透度が通常の生理的液体と本質上等しくなるように作り上げるのが好ましい。また、正常な生理的状态に合致したpHを維持するため、食塩水を緩衝化するのが好ましい。さらにある例においては、糖ペプチドのごときある種の組成物構成成分の安定性を確保するために、pHを特定のレベルに維持する必要があるかも知れない。

生理学的に許容し得る緩衝液はどれでも使用してよいが、リン酸緩衝液を用いるのが最も簡便であることがわかった。酢酸塩、トリス、重炭酸塩、炭酸塩、その他の許容し得る緩衝液のいずれもリン酸緩衝液の代わりに使用することができる。

水性成分のpHは好ましくは6.0～8.0の間であるが、そのpHが他の組成物構成成分の安定性の維持と両立する場合、またはその他の生理的に適当な理由がある場合は、系のpHを6.8に調節するのが好ましい。

この組成物に使用する緩衝食塩水の量は、組成物の価値を均一にするに必要な量である。換言すれば、その溶液を規定量とするために、100%となるに十分な量の緩衝食塩水を前記した他の成分と混合するのである。

抗原という語は、通常、蛋白または蛋白-多糖類、蛋白-リボ多糖類、多糖類、またはリボ多糖類であり、鳥または動物の血流にとって異質である場合、かかる動物の組織に対して接近する時に、特異的な抗体を生成するように刺激し、インビボまたはインビトロにおいて同一源の抗体と特異的に反応するような物質を意味する。さらにこれは、抗原のレセプターを有するT-リンパ球の増殖を促し、このリンパ球と反応して細胞性免疫と称される一連の応答を開始する。

ハプテンは、この定義の範囲内にある。ハプテンは、その免疫特異性を決定する、抗原分子または抗原複体の一部分である。普通、天然に存在する抗原においては、ハプテンはペプチドまたは多糖類である。人工的抗原の場合、ハプテンは例えばアルサニル酸誘導体のような低分子量物質であることがある。ハプテンはインビボおよびインビトロでこれと同一源の抗原またはT-リンパ球と特異的に反応する。これに代わる表現は、抗原決定基、抗原構造基およびハプテン基である。

本明細書中に記載したアジュバント組成物を用いるワクチン調製物は、抗原物質の有効量を使用する。即ち、アジュバントと組合わせた際に、対象に、ワクチンが有効であるよう意図された物質または生物による次の暴露に対する防御力を与えるように、特異的かつ十分な免疫反応を起こさせる量の抗原が含まれる。また、抗体はホルモンまたは天然に存在する物質と結合して、生長のような生物学的過程を変化させる。

本発明に使用する各々のそして全ての抗原につ

いて特定の指針を提供するような単一の投与量を指定することはできない。抗原の有効量は、明らかにそのものの固有の活性および分子量が1因子であり、特定の抗原がその供給源から精製され得る度合の関数ということになる。本発明に係るアジュバント組成物は、精製した抗原またはサブユニットまたは組換えDNA技術または合成により製造されるペプチドワクチンと同様に、完全な細胞またはウイルスワクチンと共に使用することが企図される。

アジュバント製剤は、よく知られた方法によつて容易に生成できる。例えば、緩衝食塩水中の2倍に濃縮した抗原および糖ペプチド溶液を作る。2倍の濃度のブロック重合体、油、および多相系安定化界面活性剤を緩衝食塩水と混合し、超音波処理する。次いで第1および第2の溶液を混和し超音波処理する。

以下の非限定的実施例により本発明をさらに理解することができる。

実施例1

モルモットにおける遅延型過敏症試験および卵アルブミン(EA)抗体生成試験によつて、アジュバント組成物の活性を調べた。この2種の検定は、モルモットにおいて、特定の抗原に反応してアジュバント組成物が遅延型過敏症(DH、細胞媒介反応)および抗体合成(Ab、体液性免疫反応)を刺激する能力を測定するものである。この2種の試験は以下の通りである：8匹の雌のモルモットの群に、アジュバント組成物中に乳化したEAを皮下注射する。適当な対照を含む。引き続き遅延型過敏症を測定するために動物をEAによる皮膚試験に付し、抗体タイター用の血清を得るために採血する。

標準の生物検定法を以下のごとく計画した：EA(200 μ g/動物)を食塩水に溶解し、次いで以下の6種類のアジュバント組成物の各々をもつて乳化した。

表1 第1被験組成物

成 分	量
N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン	250 μ g
トウイーン80	2 μ l
ブルロニツクL-121	25 μ l
スクアレン	50 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

表2 第2被験組成物

成 分	量
N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン	250 μ g
トウイーン80	2 μ l
ブルロニツクL-121	25 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

表3 第3被験組成物

成 分	量
N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン	250 μ g
トウイーン80	2 μ l
スクアレン	50 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

表4 第4被験組成物

成 分	量
N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン	250 μ g
ブルロニツクL-121	25 μ l
スクアレン	50 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

表5 第5被験組成物

成 分	量
ブルロニツクL-121	250 μ l
スクアレン	50 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

表6 第6被験組成物

成 分	量
N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン	250 μ g
ブルロニツクL-121	25 μ l
リン酸緩衝液により緩衝化した食塩水	適量 1000 μ l

モルモット1匹当たり0.2 mlのこのエマルジョンを投与した。食塩水中の卵アルブミンの追加抗原刺激の注射を4週目に行なった。E-A抗体のタイター値を測定するため血液試料を3および6週目に採取した。卵アルブミンの皮膚試験を6週目に実施した。これらの試験結果は以下の通りである：

表 7

遅延型過敏症および抗体生成

被験組成物	抗体タイター値		DH	
	Ab ₃	Ab ₆	Diam.	Inf.
第1	3.83	7.50	15.16	2.33
第2	3.14	6.14	14.14	2.07
第3	1.85	5.42	10.64	1.29
第4	3.42	7.85	13.35	1.64
第5	2.83	5.33	10.75	1.33
第6	2.33	5.00	11.00	1.33

Ab₃ : 3週目における抗体タイター値

Ab₆ : 6週目における抗体タイター値

DH : 遅延型過敏症

Diam : 反応の直径 (mm)

Inf : 浸潤 (1~3の尺度で評点)

実施例 2

下記の実験において、抗体の活性に対するスクアレンの効果を測定した。実施例1に記載の方法をこの試験で使用した。

表 8

成 分	量
N-アセチルムラミル-L- Thr-D-Iglu	250 μ g
トウイーン80	2 μ l
ブルロニックL-121	25 μ l
スクアレレン	50 μ l
PBS	全量1000 μ lとする

表 9

成 分	量
N-アセチルムラミル-L- Thr-D-Iglu	250 μ g
トウイーン80	2 μ l
ブルロニックL-121	25 μ l
PBS	全量1000 μ lとする

表 10

成 分	量
トウイーン80	2 μ l
ブルロニックL-121	25 μ l
PBS	全量1000 μ lとする

またはスクアレレン(SQA)10 μ l およびブルロニックL-121 5 μ l を含有する、0.2%トウイーン80を伴うリン酸緩衝液で緩衝化した食塩水0.2 mlから成る。2つの試験群には、さらに糖ジペプチドN-アセチルムラミル-L- α -アミノブチリル-D-イソグルタミン50 μ g/動物を与える。動物は28日目に食塩水中のEA50 μ gをもつて追加抗原刺激を行なう。21、35および50日目に動物の心臓に穴をあけて採血し、受動血球凝集法を用いて血清を検定する。35および50日目には、10 μ gのEAをID注射することにより皮膚試験をも行なう。この皮膚試験は24時間の時点で測定する。この実験で得られたデータを表12にまとめる。

これら3つの実施例における観察から、強力な細胞媒介性および体液性反応を導き出すためには糖ペプチドとブルロニックポリオールとの組み合わせが必須であることは明白である。これら2つの成分は必須であるが、代謝可能な油を使用することにより、細胞媒介性および体液性反応を最大とす

卵アルブミンを上記の調製物と混和し、モルモット1匹当たり0.2 mlを注射(S.C.)する。卵アルブミンの追加抗原刺激の注射を4週目に行なう。抗体の滴定値を測定するため4および6週目に動物より採血し、遅延型過敏症を測定するため6週目に卵アルブミンを用いた皮膚試験を行なう。これらの試験結果は以下の通りである：

表 11

遅延型過敏症および抗体生成

被験組成物	抗体のタイター値			DH
	Ab ₄	Ab ₆	Diam	
第1	5.00 \pm 0.37	8.25 \pm 0.31	17.70 \pm 1.12	1.94
第2	2.87 \pm 0.22	6.62 \pm 0.26	12.37 \pm 0.88	1.38
第3	2.12 \pm 0.22	6.00 \pm 0.33	10.25 \pm 0.84	1.00

略語の定義については表7を参照されたい。

実施例3

400~500gの6または7匹の雌モルモットの群を、4種の担体のうち1種に入れた200 μ gの卵アルブミン(EA)をもつて免疫にする。基礎となる担体混合物は、スクアレレン(SQE)

ることができる。

表 12
遅延過敏症および抗体生成

	抗体タイター値			35日		49日	
	Ab ₃	Ab ₅	Ab ₇	Diam.	Inf.	Diam.	Inf.
PBS 対照	2.18±.17	2.83±.31	2.83±.31	6.17±2.31	1.17	3.67±1.66	1.00
L-121 対照	2.00±.00	4.86±.74	5.57±.30	9.00±1.61	1.14	8.00±1.39	1.14
SQE/ グリコジペプチド	2.43±.37	7.43±.48	7.83±.31	17.77±1.38	2.14	12.50±1.29	1.64
SQA/ グリコジペプチド	2.29±.18	6.67±.42	7.83±.31	18.83±0.71	2.33	13.83±0.80	1.92

浸潤スコア：浸潤は1（なし）から3（強浸潤）まで評価した。

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

平 3.11.19発行

昭和 59 年特許願第 174861 号(特開昭
60-105630 号, 昭和 60 年 6 月 11 日
発行 公開特許公報 60-1057 号掲載)につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
たので下記のとおり掲載する。 3 (2)

Int. Cl. ³	識別 記号	庁内整理番号
A61K 39/39		8829-4C

7. 補正の内容

(イ) 特許請求の範囲の欄

別紙のとおり

(ロ) 発明の詳細な説明の欄

明細書第60頁第1行の前に次の文を挿入
する。

「本発明により次の事項が可能となる。

1. 抗原を第1項記載のアジュバント組成物と
混合することにより多相系を形成させ、この多相
系を鳥または哺乳動物に投与することからなる、
抗原の免疫原性の強化方法。

2. 抗原を第9項記載のアジュバント組成物と
混合することにより多相系を形成させ、この多相
系を鳥または哺乳動物に投与することからなる、
抗原の免疫原性の強化方法。」

以上

手続補正書

平成 3 年 8 月 2 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第174861号

2. 発明の名称

ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレン
ブロック重合体を基礎とするアジュバント

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 シンテックス(ユー・エス・エイ)
インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261
FAX(06)949-0361

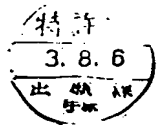
氏名 弁理士(6214) 青 山 隆

5. 補正命令の日付

自 発(審査請求と同時)

6. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄
および発明の詳細な説明の欄

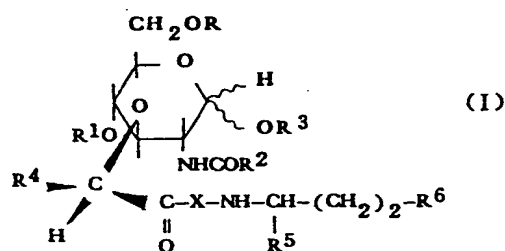


特許請求の範囲

1. 免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が
0.2~4.9容量% (V/V) である多相を形成し
得る量の非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキ
シエチレンブロック重合体、量が0.05~2.5容
量% (V/V) の間である多相を安定化する量の
グリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、お
よび容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食
塩水から成る、アジュバント組成物。

2. 糖ペプチドが0.01~2重量/容量%の間
の量で存在する、特許請求の範囲第1項記載の組
成物。

3. 糖ペプチドが式：



〔式中、R および R₁ は同一または異なつて、水素または 1～22 個の炭素原子を有するアシル基であり、

R₂ は 1～22 個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アルキル基、または 6～10 個の炭素原子を有する非置換もしくは置換アリール基であり、

R₃ は水素、アルキル、または 7～10 個の炭素原子を有するアリールであり、

R₄ は水素または 1～6 個の炭素原子を有するアルキルであり、

X は、アラニル、バリル、ロイシル、イソロイシル、α-アミノブチリル、スレオニル、メチオニル、システイニル、グルタミル、グルタミニル、アスパルテル、フェニルアラニル、チロシル、ト

リル、L-セリル、L-スレオニル、L-メチオニル、L-システイニル、L-フェニルアラニル、L-チロシル、L-トリプトファン、L-リシル、L-オルニチル、L-アルギニル、L-ヒスチジル、L-グルタミル、L-グルタミニル、L-アスパルテル、L-アスパラギニル、L-プロリル、または L-ヒドロキシプロリルより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、0.01～1% (W/V) の間の量が存在し；ブロック共重合体は分子量が 2,750～3,550 の間のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合は 5～20% であり、この共重合体は 0.2～20% (V/V) の間の量が存在し；グリコールエーテル界面活性剤は、0.2～1% (V/V) の量で存在するポリソルベート界面活性剤である、特許請求の範囲第 3 項記載の組成物。

5. 糖ペプチドが、式 (I) において、R、R₁ および R₃ が水素であり、R₂ がメチルであり、R₄ がメチルまたは水素であり、X が L-バリル、L-アラニル、L-セリル、L-スレオニルまた

リプトファン、リシル、オルニチニル、アルギニル、ヒスチジル、アスパラギニル、プロリル、ヒドロキシプロリル、セリル、またはグリシルより成る群から選ばれるアミノアシル基であり、

R₅ はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示し、

R₆ はエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基を示す

で示される化合物であり、ブロック重合体が 3,250～4,000 の間の分子量を有するポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が 0.2～20% (容量/容量) であり、生理食塩水がリン酸緩衝液で緩衝化された生理食塩水である、特許請求の範囲第 2 項記載の組成物。

4. 式 (I) の糖ペプチドにおいて、R および R₁ は同一または異なつて、水素または 1～22 個の炭素原子を有するアシル基から成る群から選ばれ、R₂ はメチルであり、R₃ は水素であり、X は、L-セリル、L-アラニル、L-バリル、L-ロイシル、L-イソロイシル、L-α-アミノブチ

ルは L-α-アミノブチリルであり、R₅ がカルボキシル、カルバモイルまたは n-ブチルカルボキシレートであり、R₆ がカルボキシルまたはカルバモイルの化合物である、特許請求の範囲第 4 項記載の組成物。

6. 糖ペプチドが、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、6-O-ステアロイル-N-アセチルムラミル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、または N-アセチルアスメチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンであつて 0.01～1% (W/V) の間の量が存在し；ブロック重合体が分子量約 3,550 のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が 10% であり、この重合体は 0.2～5% (V/V) の間の量が存在し；ポリソルベートが ^{トウイーン} TWEEN[®] 80 である、特許請求の範囲第 5 項記載の組成物。

7. 糖ペプチドが、n-ブチル-N-アセチル

ムラミル-L-アラニル-D-グルタミネート、
N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソ
グルタミン、またはN-アセチルムラミル-L-
セリル-D-イソグルタミンであり；共重合体が
分子量約3,550のポリオキシプロピレン部分を有
し、総分子中の割合として10%のポリオキシエ
チレンを含有する、特許請求の範囲第5項記載の
組成物。

8. 糖ペプチドが0.5% (w/v) の量で存在
するN-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-
イソグルタミンであり、共重合体が2.5%の量
で存在する、特許請求の範囲第6項記載の組成物。

9. 免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド；量が
0.2~4.9容量% (v/v) である多相を形成し
得る量の非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキ
シエチレンブロック重合体；量が0.05~2.5容
量% (v/v) の間である多相を安定化する量の
グリコールエーテルを基礎とする界面活性剤；量
が1~3.0容量% (v/v) の間である代謝可能
な非毒性の油；および容量を十分とするに足る量

R⁴は水素または1~6個の炭素原子を有するア
ルキルであり、

Xは、アラニル、バシル、ロイシル、イソロイシ
ル、α-アミノブチリル、スレオニル、メチオニ
ル、システイニル、グルタミル、グルタミニル、
アスパルチル、フェニルアラニル、チロシル、ト
リプトファン、リシル、オルニチニル、アルギ
ニル、ヒスチジル、アスパルギニル、プロリル、
ヒドロキシプロリル、セリル、またはグリシルよ
り成る群から選ばれるアミノアシル基であり、

R⁵はエステル化またはアミド化されていてもよ
いカルボキシル基を示し、

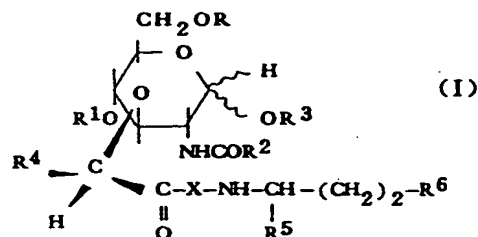
R⁶はエステル化またはアミド化されていてもよ
いカルボキシル基を示す]

で示される化合物であり、ブロック重合体が3,250
~4,000 の間の分子量を有するポリオキシプロ
ピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレ
ンの割合が0.2~20% (容量/容量) であり、
生理食塩水がリン酸緩衝液で緩衝化された生理食
塩水である、特許請求の範囲第10項記載の組成

60-105630
の緩衝等張生理食塩水から成る、アジュバント組
成物。

10. 糖ペプチドが0.01~2重量/容量%の間の
量で存在する、特許請求の範囲第9項記載の組
成物。

11. 糖ペプチドが式：



[式中、RおよびR₁は同一または異なつて、水
素または1~22個の炭素原子を有するアシル基
であり、

R₂は1~22個の炭素原子を有する非置換もし
しくは置換アルキル基、または6~10個の炭素原
子を有する非置換もしくは置換アリール基であり、

R₃は水素、アルキル、または7~10個の炭素
原子を有するアリールであり、

物。

12. 式(I)の糖ペプチドにおいて、RおよびR₁
は同一または異なつて、水素または1~22個の
炭素原子を有するアシル基から成る群から選ばれ、
R₂はメチルであり、R₃は水素であり、Xは、
L-セリル、L-アラニル、L-バシル、L-ロ
イシル、L-イソロイシル、L-α-アミノブチ
リル、L-セリル、L-スレオニル、L-メチオ
ニル、L-システイニル、L-フェニルアラニル、
L-チロシル、L-トリプトファン、L-リシ
ル、L-オルニチル、L-アルギニル、L-ヒス
チジル、L-グルタミル、L-グルタミニル、L-
アスパルチル、L-アスパラギニル、L-プロ
リル、またはL-ヒドロキシプロリルより成る群
から選ばれるアミノアシル基であり、0.01~1
% (w/v) の間の量が存在し；ブロック共重合
体は分子量が2,750~3,550の間のポリオキシ
プロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエ
チレンの割合は5~20%であり、この共重合体
は0.2~20% (v/v) の間の量が存在し；油

は1~10% (v/v) の間の量で存在するスクアレンまたはスクアランであり; グリコールエーテル界面活性剤は、0.2~1% (v/v) の量で存在するポリソルベートである、特許請求の範囲第11項記載の組成物。

13. 糖ペプチドが、式(I)において、 R_1 および R_3 が水素であり、 R_2 がメチルであり、 R_4 がメチルまたは水素であり、XがL-バリン、L-アラニン、L-セリン、L-スレオニンまたはL- α -アミノブチリルであり、 R_5 がカルボキシル、カルバモイルまたはn-ブチルカルボキシレートであり、 R_6 がカルボキシルまたはカルバモイルの化合物である、特許請求の範囲第12項記載の組成物。

14. 糖ペプチドが、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-L- α -アミノブチリル-D-イソグルタミン、6-O-ステアロイル-N-アセチルムラミル-L- α -アミノブチリル-D-イソグルタミン、またはN-アセチルデスメチルムラミル-L-

-アラニル-D-イソグルタミンであつて0.01~1% (w/v) の間の量が存在し; ブロック重合体が分子量約3550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が10%であり、この重合体は0.2~5% (v/v) の間の量が存在し; ポリソルベートがTWEEEN[®] 80である、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

15. 糖ペプチドが、n-ブチル-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミネート、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、またはN-アセチルムラミル-L-セリル-D-イソグルタミンであり; 共重合体が分子量約3,550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中の割合として10%のポリオキシエチレンを含有する、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

16. 糖ペプチドが0.5% (w/v) の量で存在するN-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミンであり、共重合体が2.5%の量

で存在する、特許請求の範囲第14項記載の組成物。

17. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2~49容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05~2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

18. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2~49容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05~2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、量が1~30容量% (v/v) の間である代謝可能な非毒性の油、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

は1~10% (v/v) の間の量で存在するスクアレンまたはスクアランであり; グリコールエーテル界面活性剤は、0.2~1% (v/v) の量で存在するポリソルベートである、特許請求の範囲第11項記載の組成物。

13. 糖ペプチドが、式(I)において、R、R₁ および R₃ が水素であり、R₂ がメチルであり、R₄ がメチルまたは水素であり、X がL-バリン、L-アラニン、L-セリン、L-スレオニンまたはL-α-アミノブチリルであり、R₅ がカルボキシル、カルバモイルまたはn-ブチルカルボキシレートであり、R₆ がカルボキシルまたはカルバモイルの化合物である、特許請求の範囲第12項記載の組成物。

14. 糖ペプチドが、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、6-O-ステアロイル-N-アセチルムラミル-L-α-アミノブチリル-D-イソグルタミン、またはN-アセチルアスメチルムラミル-L-

-アラニル-D-イソグルタミンであつて0.01~1% (w/v) の間の量が存在し; ブロック重合体が分子量約3550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中のポリオキシエチレンの割合が10%であり、この重合体は0.2~5% (v/v) の間の量が存在し; ポリソルベートがトワイーン(TW EEN)80である、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

15. 糖ペプチドが、n-ブチル-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミネート、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、またはN-アセチルムラミル-L-セリル-D-イソグルタミンであり; 共重合体が分子量約3,550のポリオキシプロピレン部分を有し、総分子中の割合として10%のポリオキシエチレンを含有する、特許請求の範囲第13項記載の組成物。

16. 糖ペプチドが0.5% (w/v) の量で存在するN-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミンであり、共重合体が2.5%の量

で存在する、特許請求の範囲第14項記載の組成物。

17. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2~4.9容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05~2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

18. 有効量の抗原、免疫強化量の免疫刺激性糖ペプチド、量が0.2~4.9容量% (v/v) である非毒性ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、量が0.05~2.5容量% (v/v) であるグリコールエーテルを基礎とする界面活性剤、量が1~30容量% (v/v) の間である代謝可能な非毒性の油、および容量を十分とするに足る量の緩衝等張生理食塩水から成る、ワクチン組成物。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.